

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-83284

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和57年(1982)5月25日

C 12 N 5/00

7235-4B

C 12 M 3/00

6971-4B

// A 01 N 1/00

6742-4H

(C 12 N 5/00

発明の数 2

審査請求 未請求

C 12 R 1/91 )

(全 7 頁)

⑮ 培養細胞の密封凍結方法および凍結容器

⑯ 発明者 井沢正雄

八王子市中野町2450

⑰ 特 願 昭55-158095

⑰ 出 願 人 オリンパス光学工業株式会社

⑱ 出 願 昭55(1980)11月12日

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番

⑲ 発明者 立川幸子

2号

八王子市並木町24-16吟風荘

⑳ 代理人 弁理士 杉村暁秀 外1名

明 細 書

1. 発明の名称 培養細胞の密封凍結方法および凍結容器

2. 特許請求の範囲

1. 可撓性で熱軟化性の材料より成る凍結容器に培養細胞の分散した細胞浮遊液を注入する工程と、この細胞浮遊液を収容した前記凍結容器を遠心分離して培養浮遊液より培養細胞を分離する工程と、分離した細胞浮遊液の上澄液を排出する工程と、この分離した培養細胞に栄養培地を注入・攪拌する工程と、前記凍結容器の開口部分を熔封する密封工程と、この密封した凍結容器を冷凍する凍結工程とを具えることを特徴とする培養細胞の密封凍結方法。

2. 前記凍結容器の開口部分を熔封する際に可撓性で熱軟化性材料より成るラベルを凍結容器に溶着することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の培養細胞の密封凍結方法。

3. 可撓性で熱軟化性材料より成り、培養細胞

と栄養培地を収容し凍結保存するアンプル部と、このアンプル部を遠心分離機に回転自在に支持する取付手部和、この取付手節により容器を支持した状態で培養細胞、栄養培地の注入、排出を行うシリンジを前記アンプル部に導くための案内部と、これらアンプル部と案内部を連結し、このアンプル部の開口部分を密封・切断して凍結用アンプルにする熔封部とを具えることを特徴とする培養細胞用凍結容器。

3. 発明の詳細な説明

本発明は培養細胞の凍結保存方法およびこれに用いる凍結容器に関するものである。

従来の培養細胞の凍結方法では培養瓶で増殖培養した細胞を各種工程に適した容器即ちガラス製遠心管、凍結アンプルを用いて凍結保存していた。

第1図は従来の培養細胞の凍結方法の操作を示すフローチャートである。

培養工程 / で培養瓶に培養液を入れ細胞を培養する、培養細胞は培養瓶の内壁に付着して増殖す

る。次に分散工程2で培養液を排出し、浮遊液を注入し、壁に付いた培養細胞をカーに分散した細胞浮遊液を作る。次に移動注入工程でこの細胞浮遊液をガラス製の遠心管に移し、遠心機装着工程4でこの遠心管を遠心機に取り付ける。次に遠心工程5で1000 rpmで5分間遠心分離して細胞浮遊液を浮遊液の上澄と細胞沈液に分離する。次に排出工程6でこの遠心管を遠心分離機より取り出して手で遠心管を傾けて上澄を排出する。次に凍結液工程7でグリセリン等の保護物質を含む栄養培地をシリンジで注入し、同時に吸引、排出を繰り返す。つくりとくり返して培養細胞を再度栄養培地中に分散させて凍結用の細胞浮遊液を得る。次に移動注入工程8でシリンジにこの細胞浮遊液を吸引しガラス製の凍結アンプルに移す。次に密封工程9で、凍結アンプルの細胞浮遊液の部分は氷冷しながらガスバーナーの炎で凍結アンプル先端部を熔封する。このようにしてできた凍結アンプルにはラベル貼布工程10で、この培養細胞の細胞名、世代数、凍結年月日等を表したラベルを貼布し、

冷凍工程11で冷凍する。この際急激な冷却で培養細胞がこわれやすい冷却速度を調節して最後には液体窒素槽につけ凍結保存する。しかし上記のような凍結方法では、培養細胞の細菌汚染を防ぐため凍結前のアンプル密封操作は速やかに行なわなければならないのに、培養細胞は培養瓶から遠心管、凍結アンプルと移し換えねばならず、又熔封作業もガスバーナーの高温下において手作業で行うため作業が煩雑で時間もかかり培養細胞が熱障害を起こすと同時に細菌汚染の危険性が大きい欠点があつた。またガラス製遠心管はその側壁に細胞がこびりつき細胞の回収率が悪い上に遠心分離機内で底が割れることもあり、ガラス製凍結アンプルは全体が、また特に熔封時には先端部が割れるので取扱いが難しく自動化の妨げになる等の多くの欠点があつた。更に従来の凍結アンプルに貼布するラベルは特に液体窒素槽内で取れやすいという欠点を有していた。

本発明の目的は上述した欠点を除去し、培養細胞の凍結保存法に関し一連の工程をより簡易化し、

細菌汚染の危険なく、高い回収率で培養細胞を凍結し、特に自動化に適するよう適切に構成した培養細胞の密封凍結方法およびその凍結容器を提供することにある。

本発明は可撓性で熱軟化性の材料より成る凍結容器に培養細胞の分散した細胞浮遊液を注入する工程と、この細胞浮遊液を収容した前記凍結容器を遠心分離して培養浮遊液より培養細胞を分離する工程と、分離した細胞浮遊液の上澄液を排出する工程と、この分離した培養細胞に栄養培地を注入・攪拌する工程と、前記凍結容器の開口部分を熔封する密封工程と、この密封した凍結容器を冷凍する凍結工程とを具えることを特徴とするものである。

本発明は可撓性で熱軟化性材料より成り、培養細胞と栄養培地を収容し凍結保存するアンプル部と、このアンプル部を遠心分離機に回動自在に支持する取つ手部と、この取つ手部により容器を支持した状態で培養細胞、栄養培地の注入、排出を行うシリンジを前記アンプル部に導くための案内

部と、これらアンプル部と案内部を連結し、このアンプル部の開口部分を密封・切断して凍結用アンプルにする熔封部とを具えることを特徴とするものである。

以下図面を参照して本発明を詳細に説明する。

第2図は本発明の培養細胞の密封凍結方法の順次の工程の一例を示すフローチャートである。培養細胞を増殖し、その培養細胞の分散した細胞浮遊液を作る工程1, 2は第1図で示した従来のものと同じである。次に移動注入工程12でこの細胞浮遊液をシリンジで吸引し本発明の可撓性で熱軟化性材料より成る凍結容器に吐出する。次に遠心機装着工程13でこの凍結容器を遠心分離機のロータのキャリアに直接取り付け。次に遠心工程14で遠心分離して細胞浮遊液を浮遊液の上澄と細胞沈液に分離する。次に遠心分離機のロータの回転を止め凍結容器をキャリア上に乗せたままシリンジにより上澄を排出する。次に凍結液工程15で別のシリンジでグリセリン等の保護物質を含む栄養培地を細胞沈液に注入し、同時に吸引排

出を緩つくりとくり返して培養細胞を再度栄養培地中に分散させた凍結用の細胞浮遊液を得る。次に密封・ラベリング工程 17 でこの凍結容器を遠心分離機のロータのキャリアに乗せたま電氣的ヒータにより加熱した熔封カッタで凍結容器を熔封し切断して凍結アンプルを得る。この際凍結容器に可撓性で熱軟化性材料より成るラベルを電氣的ヒータで溶着する。次にこのようにしてできた凍結アンプルを冷凍工程 18 で冷凍する。

第3図は本発明の培養細胞の密封凍結方法に用いる凍結容器の一例の構成を示す縦断面図である。

可撓性で熱軟化性材料本例ではテフロン(商品名)より成る凍結容器 30 は、培養細胞と栄養培地を収容し凍結保存するアンプル部 31 と、このアンプル部 31 を遠心分離機に回動自在に支持する取っ手部 32 と、この取っ手部で容器 30 を保持した状態で培養細胞、栄養培地の注入、排出を行うシリンジを前記アンプル部 31 に導くための案内部 33 と、これらアンプル部 31 と案内部 33 を連絡し、このアンプル部 31 の開口部分を密封・

切断して凍結用アンプルにする熔封部 34 を具える。このような構成の本発明凍結容器の動作を第4図に示す。

第4図(a)および(b)は回転中の本発明凍結容器と遠心分離機のキャリアの一例の構成を示す縦断面図および側面図である。凍結容器 31 の取っ手部 32 は遠心分離機のロータのキャリア 35 に第4図(b)のように引っかけるのでアンプル部 31 に細胞浮遊液を入れてキャリア 35 を回転すれば第4図(a)の矢印 A 方向に遠心力がかかり細胞浮遊液 36 より細胞沈渣 37 を分離できる。

第5図は遠心分離後の本発明凍結容器の動作を説明するための縦断面図である。遠心分離を行なった後、遠心分離機のキャリア 35 の回転を止め、凍結容器 30 をその取っ手部 32 を中心にして回動し垂直にたれ下げる。次にシリンジ 38 を凍結容器 30 内に挿入し図示しない廃液装置のポンプ装置で細胞浮遊液の上層を吸引し廃棄する。この時細胞沈渣 37 を舞い上がらせない様にシリンジ 38 のさし込み深度を調節しシリンジ 38 の先端が細胞

沈渣 37 と一定距離を保つようにし、培養細胞の利用率を高める。次に上層を取り除いた後、第4図(b)に示すように凍結容器 31 を垂直に保持し、シリンジ 39 を凍結容器 30 内に挿入し、図示しないポンプ装置でグリセリンに細胞保護物質を含有した栄養培地(BMES+)を1mm程度、アンプル部の約半量を目安にして注入し、適当に吸引、排出を行ない細胞沈渣 37 が栄養培地に均一に分散した凍結用の細胞浮遊液を作る。

第6図は本発明凍結容器の熔封方法を説明するための一例の構成を示す縦断面図である。凍結容器 30 の熔封部 34 に電氣的内蔵ヒータにより 300℃程に熱した一対のステンレス製の熔封カッタ 40 を両側より挟むよう第6図(a)の矢印 B 方向に押しつけ熔封し、そして切断する。第6図(b)は熔封後切断した状態を示す。凍結容器 30 の案内部 33 と熔封部 34 の一部は一緒に廃棄し、アンプル部 31 と熔封部 34 の一部は凍結アンプルとして凍結保存する。尚熔封カッタ 40 の互いに対向する面には切断のための鋭利な突起を設けてもよい。

第7図(a)および(b)は本発明の凍結アンプルに可撓性で熱軟化性の材料、本例ではテフロンより成るラベル 41 を溶着した一例の構成を示す正面図および側面図である。上述の凍結アンプルの熔封の際熔封カッタ 40 で細胞名、世代数、凍結年月日等を印字したテフロン製ラベル 41 と熔封部 34 を同時に溶着する。テフロン製ラベル 41 はその溶着部で凍結アンプルと一体に溶着するので紙ラベル等の接層に比べ確実に固定することができる。

以上の説明から明らかなように本発明の培養細胞の密封凍結方法およびその凍結容器によれば、培養瓶で培養した培養細胞の移動は一度凍結容器に移すだけであり、従来の遠心管からアンプルに移す工程が省略でき、その分の培養細胞の利用率を高めることができると共に、遠心分離工程からアンプル熔封に至るまでの工程は遠心分離機のキャリア上で行なえるのでこの間の処理時間が短縮でき培養細胞の細菌汚染の危険性を少なくできる利点がある。従つて高速化、自動化に適用しやすい効果がある。

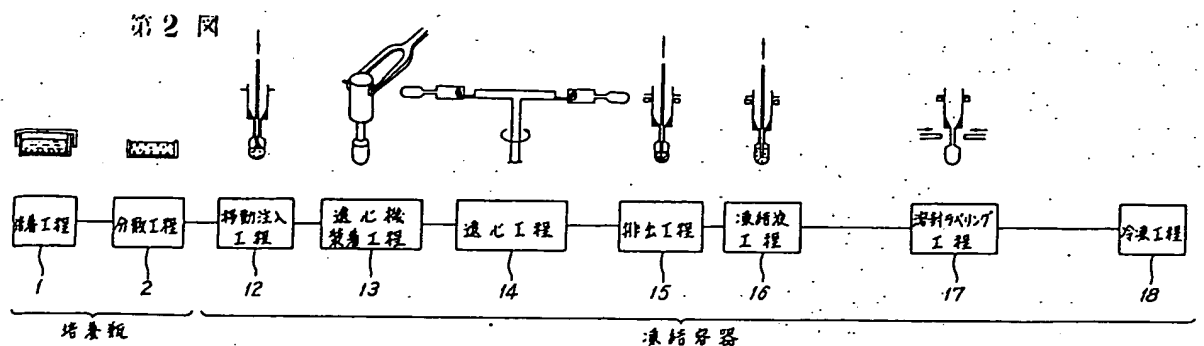
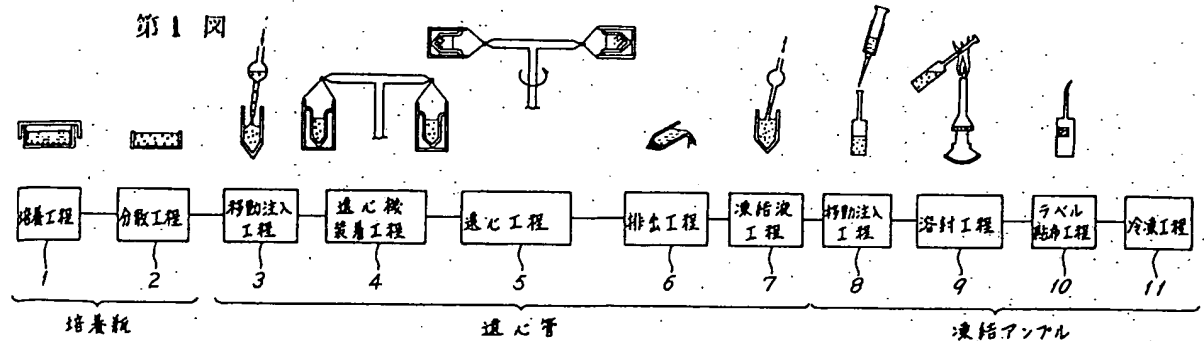
また本発明の凍結容器は可撓性で熱軟化性の材料例えばテフロン（商品名）より成るので、電気的ヒータを内蔵した金属性カッタによりガスの炎を使用しないでかなり低温で熔封できるので培養細胞に熱障害が起りにくく解凍後の細胞の生存率を高められる利点がある。またガラス製容器に比べ割れにくく、高圧蒸気滅菌が可能となり作業の高速化、自動化に適用できる利点がある。更に熔封工程の際、可撓性で熱軟化性の材料、例えばテフロンより成るラベルを同時に溶着すれば、液体窒素の浸漬中にもはがれないマーカとなる効果がある。

#### 4. 図面の簡単な説明

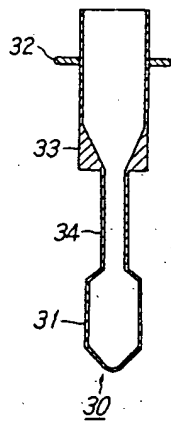
第1図は従来培養細胞の凍結方法の順次の工程を示すフローチャート、第2図は本発明の培養細胞の密封凍結方法の順次工程の一例を示すフローチャート、第3図は本発明の培養細胞の密封凍結方法に用いる凍結容器の一例の構成を示す縦断面図、第4図(a)および(b)は回転中の本発明凍結容器と遠心分離機のキャリアの一例の構成を示す

縦断面図および側面図、第5図は遠心分離後の本発明凍結容器の動作を説明するための縦図、第6図は本発明凍結容器の熔封方法を説明するための一例の構成を示す縦図、第7図(a)および(b)は本発明の凍結アンプルにテフロンより成るラベルを溶着した一例の構成を示す正面図および側面図である。

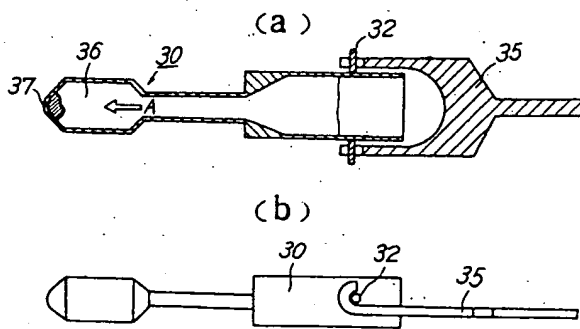
30…凍結容器、31…アンプル部、32…取っ手部、33…案内部、34…熔封部、35…キャリア、36…細胞存遊液、37…細胞沈渣、38、39…シリンジ、40…熔封カッタ、41…テフロン製ラベル。



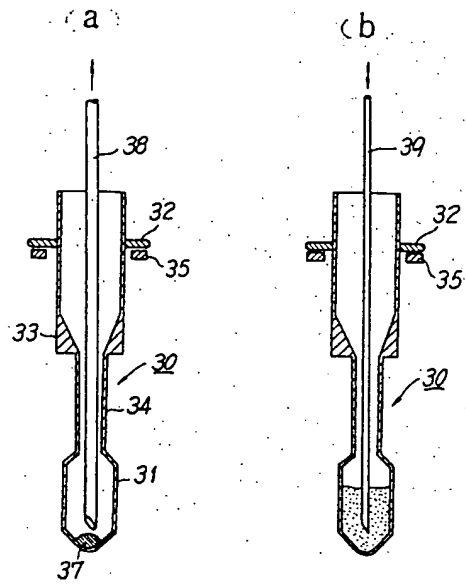
第 3 図



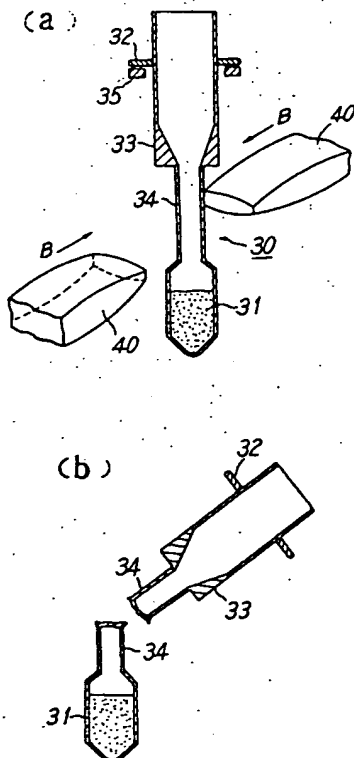
第 4 図



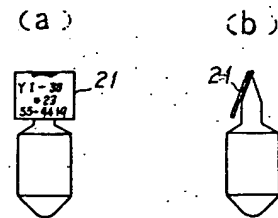
第 5 図



第 6 図



第 7 図



手 続 補 正 書

昭和 36 年 / 月 22 日

特許庁 長官  
審判長  
審査官 島 田 春 樹 殿

1. 事件の表示

昭和 35 年 特 許 願 第 158095 号

2. 発明の名称

培養細胞の密封凍結方法  
および凍結容器

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(037) オリンパス光学工業株式会社

4. 代理人

〒100 東京都千代田区霞が関3丁目2番4号  
森 山 ビルディング 7 階  
電話 (581) 2241 番 (代表)

(5925) 弁理士 杉 村 暁 秀 監  
外 1 名

5.

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄および図面

7. 補正の内容 (別紙の通り)

特開昭57- 83284(6)

1. 明細書第3頁第1〜2行を「る。次に分散工程  
2でこの培養液を排出し、新しい培養液を注入  
し吸引排出をくり返し、遂に付いた培養細胞を  
均一に分散した飼」に訂正する。

2. 同第7頁第14行の「12」を「32」に訂正する。

3. 同第9頁第2行の「利用率」を「回収率」に訂  
正し、

同頁第6行の「(BMES+)」を「(BME(S+))」  
に訂正する。

4. 同第10頁第14行の「利用率」を「回収率」に訂  
正する。

5. 図面中第7図(a)、(b)を別紙の通り訂正する。

代理人弁理士 杉 村 暁 秀 監  
外 1 名

手 続 補 正 書

昭和 36 年 12 月 10 日

特許庁 長官  
審判長  
審査官 島 田 春 樹 殿

1. 事件の表示

昭和 35 年 特 許 願 第 158095 号

2. 発明の名称

培養細胞の密封凍結方法および凍結容器

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(037) オリンパス光学工業株式会社

4. 代理人

〒100 東京都千代田区霞が関3丁目2番4号  
森 山 ビルディング 7 階  
電話 (581) 2241 番 (代表)

(5925) 弁理士 杉 村 暁 秀 監  
外 1 名

5.

6. 補正の対象

明細書中発明の詳細な説明、図面の簡単な説明の欄

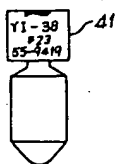
7. 補正の内容 (別紙の通り)

第 7 図

(訂正

(a)

(b)



1. 明細書第3頁第3行「移動注入工程で」を「移動注入工程3で」に訂正する。
2. 同第3頁第10行「グリセリン等の保護物質を含む」を「保護物質を含むグリセリン等の」に訂正する。
3. 同第3頁第20行「貼布」を「貼付」に訂正する。
4. 同第7頁第18行「シリンジ」を「ためのノズル」に訂正する。
5. 同第8頁第12行「容器の動作」を「方法の工程」に訂正する。
6. 同第8頁第16行「シリンジ」を「第5図(a)に示すようにノズル」に訂正する。
7. 同第8頁第19行、第20行、第9頁第4行、第12頁第11行「シリンジ」を「ノズル」に訂正する。
8. 同第9頁第2行「第4」を「第5」に訂正する。
9. 同第9頁第3行「保持し、」を「保持したまま、」に訂正する。

代理人弁理士 杉 村 聡

秀

外

名

